

RECOMENDACIONES PARA EL ALMACENAMIENTO DE SUEROS ABSORBIDOS EN PAPEL DE FILTRO BAJO CONDICIONES RURALES, PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN CHAGÁSICA CON LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Cornelis J. MARINKELLE, Nhora de SÁNCHEZ, Max GRÜGL y Felipe GUHL (1)

RESUMEN

Anticuerpos inmunofluorescentes contra la enfermedad de Chagas absorbidos en papel de filtro, son afectados por altas temperaturas medioambientales y altas humedades relativas. Cuando los papeles de filtro se mantuvieron en bolsas de polietileno con gel de sílica a 25°C ó a temperaturas inferiores y se almacenaron durante un año, los anticuerpos bajaron solamente un título. Se dan recomendaciones para mejorar el almacenamiento de las muestras en papel de filtro bajo condiciones rurales durante largos períodos de tiempo.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas prevalece en áreas rurales donde no existen facilidades para realizar pruebas serodiagnósticas, sin contar con que el envío de sueros a distantes centros de diagnóstico es usualmente complicado. Existe un método práctico para mandar muestras de suero o sangre para diagnosticar con pruebas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (IIIA), varias enfermedades parasitarias. El método consiste en la absorción de suero o de gotas de sangre en papeles de filtro 1-3.5-7. La ventaja es la facilidad de enviar muestras desde áreas lejanas, hacia laboratorios especializados; por ejemplo por vía aérea.

En general se considera que, tanto altas temperaturas como altas humedades ambientales, tienen un efecto deteriorante sobre anticuerpos presentes en el papel de filtro, almacenados por periodos de tiempo prolongados. Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen estudios detallados sobre el efecto de la temperatura y la humedad en la conservación de títulos contra enfermedades parasitarias, como la enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y METODOS

Se cortaron discos de papel de filtro Whatman No. 42 de 7 mm de diámetro, cada uno de los cuales permitió absorber ca 0,005 ml de un suero patrón. Los papeles se distribuyeron en diferentes tubos de ensayo tapados posteriormente con algodón. Un grupo de ellos se sometió a una humedad relativa superior al 90% con algodón húmedo. Otro grupo con gel de sílica, con humedad relativa inferior al 10%; mientras un tercer grupo permaneció a condiciones ambientales. Todos los tubos de los dos primeros grupos se guardaron en bolsas de polietileno bien selladas, colocándolos después a diferentes temperaturas: 36°C±1°C, 25°C±1°C, 20°C±1°C, 4°C±1°C y -20°C, durante un periodo de tiempo entre dos semanas y 16 meses. El tercer grupo se mantuvo durante el mismo tiempo a temperatura (ca 18-22°C) y humedad relativa de laboratorio (30-35%).

A los sueros extraídos de los discos de papel de filtro se les practicó la prueba de IFI⁴ en duplicado, a las dos semanas 3, 6, 12, 14 y 16 meses respectivamente después de haberse guardado.

(1) Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Universidad de los Andes, A.A. No. 4976, Bogotá, Colombia.

Para llevar a cabo la reacción, se sacaron de cada tubo de ensayo dos discos de papel de filtro con 0,005 ml de suero patrón. Utilizando una microplaca se les agregó 0,070 ml de PBS pH 7, 2 a cada par de círculos, permaneciendo allí durante media hora; tiempo suficiente para la dilución del suero del papel de filtro. Al final se obtuvo una dilución de 1:8. A partir de ésta se hicieron las siguientes diluciones². Durante la ejecución de la prueba de IFI, se incluyeron como controles sueros positivos con títulos conocidos y sueros negati-

vos. Una parte del suero original, utilizado para la preparación de los papeles de filtro, se dividió en pequeños volúmenes que se mantuvieron a -70°C.

Este suero patrón tenía un título inicial de 1:256 para anticuerpos contra antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con la prueba de IFI se muestran en la Tabla I. Los sueros ex-

T A B L A I

Títulos de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la prueba indirecta de inmunofluorescencia en el suero patrón extraído de papeles de filtro, anteriormente mantenidos a diferentes condiciones ambientales durante diferentes períodos de tiempo.

Temperatura ± 1°C	Humedad relativa %	Tiempo de almacenamiento de los papeles de filtro (meses)					
		0,5	3	6	12	14	16
+ 36°C	> 90	1:256	1:128	<1:16	<1:16	<1:16	<1:16
+ 36°C	< 10	1:256	1:256	1:64	<1:16	<1:16	<1:16
+ 25°C	> 90	1:356	1:128	1:32	<1:16	<1:16	<1:16
+ 25°C	< 10	1:256	1:256	1:128	1:128	1:64	<1:16
+ 20°C	> 90	1:256	1:128	1:128	1:64	1:32	<1:16
+ 18 - 22°C	30 - 35 *	1:256	1:128	1:32	<1:16	<1:16	<1:16
+ 20°C	< 10	1:256	1:256	1:128	1:128	1:128	1:32
+ 4°C	> 90	1:256	1:256	1:128	1:128	1:128	1:64
+ 4°C	< 10	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	1:64
- 20°C	> 90	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128
- 20°C	< 10	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128

* Condición de laboratorio.

traídos de los papeles de filtro que se mantuvieron con humedad relativa superior al 90% y a temperaturas superiores a 20°C, bajaron sus títulos más rápidamente que aquellos que se guardaron a una humedad inferior al 10% y a temperaturas entre -4°C y 20°C.

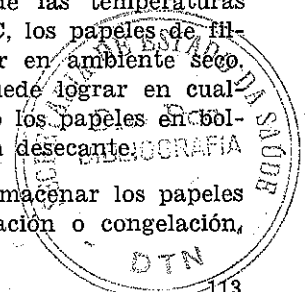
Los papeles de filtro guardados a temperatura y humedad de laboratorio dieron los mismos títulos que aquellos que permanecieron a 25°C con humedades relativas altas. El suero control mantenido a -70°C durante los 16 meses del experimento conservó su título de 1:256.

DISCUSION Y RECOMENDACIONES

Los resultados indican que la preservación de sueros sobre papel de filtro para fines se-

rológicos en condiciones rurales, darán resultados confiables si las siguientes recomendaciones se tomaran en consideración:

- 1) Los papeles de filtro deben procesarse entre los primeros tres meses cuando permanecen guardados a altas humedades relativas como a temperaturas superiores a 20°C.
- 2) En condiciones donde las temperaturas son superiores a 20°C, los papeles de filtro se deben guardar en ambiente seco. Esta condición se puede lograr en cualquier sitio guardando los papeles en bolsas de polietileno con desecante.
- 3) Cuando se pueden almacenar los papeles de filtro en refrigeración o congelación,



las muestras se pueden mantener durante un año sin pérdidas mayor a un título de anticuerpos.

Aunque una variación de un título es generalmente considerada como insignificante, durante nuestros estudios nunca se encontró diferencia en títulos del suero control mantenido a -70°C . Esta es la razón por la cual variaciones en un título del suero en el experimento se mencionan en la tabla.

SUMMARY

Recommendations for the storage of serum absorbed on filter paper in rural area, for the diagnosis of Chagas' disease by immunofluorescent test.

Immunofluorescent antibodies against Chagas' disease in serum absorbed on filter paper are effected by high environmental temperatures and high relative humidities.

When filter papers were kept in plastic bags with silical gel at temperatures of 25°C or lower, and stored over a period of one year, antibodies decreased only with one titer.

Recommendations are given to improve the storage of the filter paper samples under rural conditions for longer periods of time.

REFERENCIAS

1. ALLAIN, D. S. & KAGAN, I. G. — An evaluation of direct agglutination test for Chagas' disease. *J. Parasit.* 60: 179-184, 1974.

2. ALVAREZ, M.; DE RISSO, A. M.; MARTINI, G. J. M. de; ABRAMO, L. & CERISOLA, J. A. — Recolección de sangre en papel para diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. *Bol. Chile. Parasit.* 26: 2-7, 1971.
3. BAILEY, N. M.; CUNNINGHAM, M. P. & KIMBER, C. D. — The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood, for use as screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61: 696-700, 1976.
4. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 227-234, 1966.
5. JEFFERY, G. M.; WARREN, M.; COLLINS, W. E. & LOBEL, H. — Application of the indirect fluorescent antibody method in a study of malaria endemicity in Mato Grosso, Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 402-411, 1975.
6. SADUN, E. H.; ANDERSON, R. I. & WILLIAMS, J. S. — Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of schistosomiasis in human by using dried blood smear on filter paper. *Exptl. Parasit.* 11: 117-120, 1961.
7. SOUZA, S. L. de & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smear in practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 255-258, 1966.

Recebido para publicação em 20/4/1977.